

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M.H

097762041

PCT/JP99/04333

10.08.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/4333

REC'D 27 SEP 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 8月11日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第227398号

出 願 人
Applicant(s):

株式会社ディナベック研究所

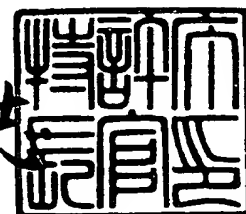
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-305984

【書類名】 特許願

【整理番号】 D3-002

【提出日】 平成10年 8月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/86

【発明の名称】 接触浸潤力を有するRNAウイルスベクター

【請求項の数】 27

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府豊中市二葉町3丁目2番1号 シオノギ神崎川寮
 319号室

 【氏名】 浅川 誠

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社デ
 ィナベック研究所内

 【氏名】 長谷川 護

【特許出願人】

 【識別番号】 595155107

 【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

 【代表者】 中富 博隆

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

特平 1 0 - 2 2 7 3

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716812

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 接触浸潤力を有するRNAウイルスベクター

【特許請求の範囲】

【請求項1】 接触浸潤力に関わる遺伝子群及びRNA自律複製能に関わる遺伝子群を有するが伝播力に関わる遺伝子群が欠失または不活化された、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体を形成するためのRNA。

【請求項2】 エンベロープとウイルスコアとの両者と相互作用をする蛋白質をコードする遺伝子が欠失または不活化されていることを特徴とする請求項1記載のRNA。

【請求項3】 エンベロープとウイルスコアとの両者と相互作用をする蛋白質がマトリックス蛋白質（M蛋白質）であることを特徴とする請求項2記載のRNA。

【請求項4】 RNAが非分節型（-）鎖RNAウイルス由来であることを特徴とする、請求項1記載のRNA。

【請求項5】 外来性遺伝子を含むことを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載のRNA。

【請求項6】 RNAがセンダイウイルス由来で、M蛋白質に相当する遺伝子が欠失または不活化されていることを特徴とする、請求項1記載のRNA。

【請求項7】 外来性遺伝子を含むことを特徴とする請求項6記載のRNA。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載のRNAを含有する、該RNAを複製しかつ接触浸潤により該RNAを別の細胞に伝達することができる細胞。

【請求項9】 請求項1～7のいずれかに記載のRNAを、試験管内または細胞内で転写することのできる鋳型DNAを含むDNA。

【請求項10】 請求項1～4のいずれかに記載のRNAと、核酸を含まないウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体。

【請求項11】 請求項5記載のRNAと、核酸を含まないウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播

力を有さない複合体。

【請求項 12】 請求項 6 記載の RNA と、核酸を含まないセンダイウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能、RNA 自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体。

【請求項 13】 請求項 7 記載の RNA と、核酸を含まないセンダイウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能、RNA 自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体。

【請求項 14】 伝播力に関わる蛋白質をコードする遺伝子を染色体上に有する、請求項 10 または 11 に記載の複合体を製造するための宿主。

【請求項 15】 センダイウイルス M 蛋白質をコードする遺伝子を染色体上に有する、請求項 12 または 13 に記載の複合体を製造するための宿主。

【請求項 16】 a) 請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の RNA もしくは該 RNA の cRNA、または該 RNA もしくは該 cRNA を生合成しうるユニット

b) 該 RNA もしくは該 cRNA の複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット

c) 該複合体の伝播力に関わる蛋白質群、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

の 3 者を含むキット。

【請求項 17】 a) 請求項 6 または 7 に記載の RNA もしくは該 RNA の cRNA、または該 RNA もしくは該 cRNA を生合成しうるユニット

b) センダイウイルスの NP, P/C, L 蛋白質のすべて、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

c) センダイウイルスの、M 蛋白質、または該蛋白質を生合成しうるユニットの 3 者を含むキット。

【請求項 18】 a) 請求項 10 または 11 のいずれかに記載の複合体に含まれる RNA もしくは該 RNA の cRNA、または該 RNA もしくは該 cRNA を生合成しうるユニット

b) 該 RNA もしくは該 cRNA の複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット

c)請求項14記載の宿主

の3者を含むキット。

【請求項19】 a)請求項12または13に記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット

b)センダイウイルスのNP, P/C, L蛋白質のすべて、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

c)請求項15記載の宿主

の3者を含むキット。

【請求項20】 a)請求項10または11に記載の複合体

b)請求項14記載の宿主

の2者を含むキット。

【請求項21】 a)請求項12または13に記載の複合体

b)請求項15記載の宿主

の2者を含むキット。

【請求項22】 宿主内に、請求項16記載のa), b)およびc)の3者を導入することにより、請求項10または11に記載の複合体を製造する方法。

【請求項23】 宿主内に、請求項17記載のa), b)およびc)の3者を導入することにより、請求項12または13に記載の複合体を製造する方法。

【請求項24】 請求項18記載のc)の宿主に、請求項18記載のa)およびb)の両者を導入することにより、請求項10または11に記載の複合体を製造する方法。

【請求項25】 請求項19記載のc)の宿主に、請求項19記載のa)およびb)の両者を導入することにより、請求項12または13に記載の複合体を製造する方法。

【請求項26】 請求項20記載のa)の複合体を、請求項20記載のb)の宿主に感染させることにより、該複合体を製造する方法。

【請求項27】 請求項21記載のa)の複合体を、請求項21記載のb)の宿主に感染させることにより、該複合体を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子治療等に用いられるウイルスベクターに関する。詳しくは、本発明は不活化された（－）鎖RNAウイルスベクターに関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトや動物に対する遺伝子治療において、治療効果と安全性は極めて重要な課題である。特に、ウイルスの遺伝子を組換えることにより得られる「ウイルスベクター」を用いて行われる治療は、たとえ治療効果が認められる場合でも、遺伝子が染色体DNAの不特定な位置に挿入されたり、組換え体ウイルスや病原性ウイルスが自然界に放出されたり、細胞内に導入された遺伝子発現の制御ができない等の可能性を否定できない場合には、治療行為を極めて慎重に行う必要がある。

【0003】

ウイルスベクターは、ウイルスの感染能を利用して目的遺伝子を標的細胞内に導入するために主に用いられる。本明細書においてはウイルスベクターの「感染能」とは、「ウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能等を保持していることにより、細胞内にウイルス内部の核酸等を導入することのできる能力」のことを言う。ウイルス遺伝子に目的遺伝子を挿入する等の遺伝子操作を施した組換え型ウイルスベクターの表面には、ウイルス由来のエンベロープ蛋白質等が存在しており、それが由来するウイルスの感染能を保有しているので、その内部の組換え遺伝子を細胞内に導入することが可能となる。このような組換え型ウイルスベクターは、遺伝子治療の目的のみならず、目的遺伝子発現細胞の作製、トランスジェニック動物作製等の目的に使用することが可能である。

【0004】

ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、DNAウイルスベクター、RNAウイルスベクターの3者に分類されるが、染色体に挿入されることがないという安全性の面でRNAウイルスベクターは有利である。このような技術背景からすでにセンダイウイルス等の非分節型（－）鎖RNAウイルスをベースとしたウイルスベクターが提供されている（D.Yuら, Genes To Cells, 2:457-466, 1997, M.Hasanら

,J.Gen.Virol. 78:2813-2820,1997)。中でも、本発明者らは、伝播力を有さないが感染力とRNAの自律複製能を有する（一）鎖RNAウイルスベクターをすでに開発している（国際公開 97/16538号参照）。なお、伝播力とは、本明細書において「感染や人工的な手法で核酸が細胞内に導入された後、細胞内に存在する該核酸が複製後、感染性粒子またはそれに準ずる複合体を形成し、別の細胞に伝播することのできる能力」のことである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、遺伝子治療等に有用な、RNAウイルスベクターを提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはまず、（一）鎖RNAウイルスの代表格であり、安全性や利便性の点からベクターとして産業上最も有用であると考えられるセンダイウイルスの核酸を用いて種々の欠損型変異体を取得し、これらの欠損型変異体を公知の手法によりウイルス再構成試験に供した。すると、M遺伝子に障害を有する変異体に由来する再構成複合体が、野生株よりも小さなプラークを形成する能力があるが、鶏卵中で増殖しないことを見だし、該変異株は、細胞感染能、RNA自律複製能及び接触浸潤力を有するが伝播力を有さないことを確認した。なお、本明細書において接触浸潤力とは、「ウイルスベクター遺伝子を保持する細胞が別の細胞と接触することによりその遺伝子をその細胞に伝達することのできる能力」のことをいう。更に、M遺伝子に障害を有する欠損型変異体由来するプラークは、抗センダイウイルス抗体では染色されるが、抗Mモノクローナル抗体では染色されなかったことから、該M変異株は、完全なMタンパク質を欠くプラークであることを確認し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、特許請求の範囲に記載の各発明からなる。

【0007】

伝播力を有さないが、接触浸潤力を有するウイルスは、これをベクターとして用いたときに、既存の、接触浸潤力を有さないウイルスベクターの持つ致命的な

欠点を補うものである。すなわち、ウイルスベクターを細胞に感染させてタンパク質を発現させる場合、既存のベクターでは、直接的にウイルスベクターが感染した細胞でしか発現させることができない。細胞が一層に並び、すべての細胞に直接的にウイルスベクターを感染させることのできる培養細胞系では問題にならないが、細胞が立体的に多層的に存在する生体内に直接感染させることを考えた場合、ウイルスベクターを直接感染させることのできる部位、あるいは細胞数は限られている。たとえば腫瘍部位にウイルスベクターを直接感染させた場合、腫瘍を形成する細胞すべてに感染させることは非常に困難である。

【0008】

これに対して、接触浸潤力を有するウイルスベクターの場合、直接的には一部の細胞にしか感染しなくても、そこから隣接した細胞を介して、たとえば腫瘍全体に感染させることができる。また、このウイルスベクターは、伝播力を有さないもので、血流に乗って全身の細胞が感染する可能性はない。

すなわち、このウイルスベクターは、遺伝子治療に用いた場合、特定の臓器、特定の部分に限りすべての細胞に感染し、なおかつ全身に感染するおそれのないという新しい特徴を持ったウイルスベクターということができる。

【0009】

また、本発明の細胞感染能、RNA自律複製能及び接触浸潤力を有するが伝播力を有さないウイルスベクターを保持する細胞は、細胞移植用の細胞として利用することができる。すなわち、細胞内に封じ込められたウイルスベクターを保持する細胞を、治療を要する部位に必要量だけ移植することが可能になる。ことに、自律複製能を有するベクターを持つ細胞が接触浸潤力をもち、内部のベクターを他の細胞に侵入させられれば好適である。

なお、M遺伝子が欠損した麻疹ウイルス(Measles virus)は、感染粒子の形成が阻害され、細胞融合が促進されることが報告されている(T. Cathomenら, EMBO J., 1998, 17: 3899-3908)が、このウイルスをベクターとして使用する可能性については全く示唆されていない。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明の（一）鎖RNAウイルスの材料となるウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科の(Paramyxoviridae)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular S)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。DI粒子(J. Virol. 68, 8413-8417(1994))等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、材料として使用することができる。

材料となる（一）鎖RNAウイルスとしては、上記のいずれかのウイルスに由来する組換え体（一）鎖RNAウイルスを用いてもよい。組換え体（一）鎖RNAウイルスは、たとえば免疫原性に関与する遺伝子を不活性化したり、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、一部の遺伝子を改変したものでよい。

【0011】

本発明のRNAと蛋白質との複合体に含まれるRNAは、前記のいずれかのウイルスまたは組換え体ウイルスのcDNAを改変したものを試験管内または細胞内で転写することにより得ることができる。このとき得られるRNAは、由来するウイルスの伝播力に関わる少なくとも1つの遺伝子が欠失または不活化していることが必要であるが、自律複製および接触浸潤力に関わる遺伝子が欠失または不活化してはならない。また、DI分子など、ウイルスゲノムの両端構造を持つcDNAに、人工的に自律複製に関わる遺伝子群を挿入したDNAを試験管内または細胞内で転写することにより得られる人工的な配列を持つRNA分子も、同様に用いることが可能である。

【0012】

センダイウイルスの場合は、「自律複製に関わる遺伝子」とは、NP、P/C、Lのいずれかの遺伝子であり、「伝播力に関わる遺伝子」とは、M、F、HNのいずれかの遺伝子である。また、M遺伝子のみを欠失または不活化させた場合、「伝播力」は消失するが、「接触浸潤力」は残存する。したがって、例えばM遺伝子のみ

を欠失させたセンダイウイルスZ株のRNAは、本発明の「複合体」に含まれる成分として適当である。ただし、これらの遺伝子群はウイルス由来の配列そのままでなくとも、転写、複製における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいはほかのウイルスの相当遺伝子で代用してもよい。

【0013】

センダイウイルスの場合、M遺伝子のみを欠失させたセンダイウイルスのRNAと、センダイウイルスからRNAだけを除去したものからなる複合体は、感染能と自律複製能を有するが伝播力は有さない複合体である。複合体は、伝播力を付与しないものであれば、これら以外のものを含んでも構わない。例えば、エンペロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等が含まれていても構わない。

【0014】

複合体に含まれるRNAは、適当な部位に外来性遺伝子が挿入されたものでもよい。所望のタンパク質を発現させるためには、所望のタンパク質をコードする外来性遺伝子を挿入する。センダイウイルスRNA (ジェンバンクアクセッション番号M30202)においては、R1配列とR2配列との間に、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol.67, No.8, (1993)p.4822-4830)。R1配列およびR2配列のコンセンサス配列はそれぞれ (5'-AGGGWBAAWGD-3') および (5'-DTAAGAAAAA-3') である。挿入した外来性遺伝子の発現量は、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後のRNA塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスRNAにおいては、挿入位置がNP遺伝子に近いほど、挿入された遺伝子の発現量が多いことが知られている。

【0015】

複合体に含まれるRNAにコードされた外来遺伝子は、この複合体を細胞に感染させることにより発現させることができる。すなわち、鶏卵であれば鶏卵に接種する、動物生体内の組織であれば該当組織に接種することによりその組織内で外来遺伝子を発現させることができる。この場合、この複合体は通常のウイルスと異なり伝播力を消失しているので、接種した後の大幅な増殖が見込めない。そのため、極めて大量のタンパク質を発現させるためには、大量の複合体を感染させ

る必要がある。また、複合体に含まれるRNAにおいて欠如している遺伝子群を発現している細胞またはトランスジェニック個体（トランスジェニック鳥類の卵など）を用いることもできる。

【0016】

なお、センダイウイルスの効率良い粒子再構成のためには、細胞内に導入するcDNAの形態が線状よりも環状のほうが良く、また（-）鎖RNAが細胞内で転写されるよりも、（+）鎖RNAが細胞内で転写されるほうが粒子形成効率が高いことが、本発明者によって確認されている（A.Katoら, Genes To Cells, 1:569-579, 1996）。これらの条件が他のすべての（-）鎖RNAウイルス再構成に適用できるとは限らないが、他の（-）鎖RNAウイルス再構成に際しても、本明細書の記載内容および技術常識に基づいて適宜条件を検索することは可能である。

【0017】

また、本発明は、a)請求項1～5のいずれかに記載のRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット、b)該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット、c)該複体の伝播力に関わる蛋白質群、または該蛋白質群を生合成しうるユニット、の3者を含むキットに関する。適当な宿主内に、a)、b)及びc)の3者を導入することによって、請求項10または11に記載の、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体を製造することができる。

【0018】

また、本発明は、a)請求項10または11のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット、b)該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット、c)請求項14記載の宿主、の3者を含むキットに関する。c)の宿主内にa)及びb)を導入することによって、請求項10または11に記載の、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体を製造することができる。

【0019】

更に、本発明は、a)請求項10または11に記載の複合体、b)請求項14記載

の宿主、の2者を含むキットに関する。a)の複合体をb)の宿主に導入することによって、請求項10または11に記載の、細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さない複合体を製造することができる。

【0020】

これらに用いる宿主としては、伝播力に関する遺伝子のうち、複合体に含まれるRNAにおいて欠如している遺伝子群を発現している細胞が好適に用いられる。たとえばこれらの遺伝子群をコードしているプラスミドの細胞内導入などの一過性の発現でもかまわないが、染色体に組込まれて安定に発現する方が好適である。この場合、大量生産のためには該遺伝子群を発現しているトランスジェニック鳥類の卵が特に好適である。トランスジェニック鳥類の作出法は公知であり [Poultry Sci., 65, 1445-1458 (1986)、Bio/Technology, 12, 60-63 (1994)]、該遺伝子群を染色体上に保持するトランスジェニック鳥類を作出することは、当業者が適宜なしうることである。なお、発現させる遺伝子群は、野生型のものである必要はなく、野生型と同等の機能を有するものであればよい。即ち、遺伝子が機能的に導入された細胞に、本発明の複合体を導入した際、細胞感染能を有する複合体が形成されるものであればよい。

【0021】

また、伝播力に関する遺伝子のうち、複合体に含まれるRNAにおいて欠如している遺伝子群を発現している宿主細胞において、該遺伝子群に加え、自律複製に関わる遺伝子群をも発現させることも可能である。このような宿主細胞を使えば、自律複製に関わる遺伝子群や複合体を導入しなくても、本発明のRNA、またはそれを発現できるベクターのみを導入することによって複合体を生産することが可能となる。生産された複合体は、例えば、培養細胞を宿主とする場合には培養液から、鶏卵を宿主とする場合には尿漿液から、常法によって回収しうる。

【0022】

なお、本発明の一態様としての、M遺伝子が欠失または不活性化したセンダイウイルスの複合体が標的細胞へ感染後、接触浸潤により周辺の細胞に本発明に含まれるRNAが浸潤する過程を、図9として例示する。

【0023】

【実施例】

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】 センダイウイルス由来M遺伝子のサブクローニング

以下に実施するすべてのライゲーション反応、末端平滑化反応および脱リン酸化処理にはTakara Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社、京都)、Takara Blunting Kit (宝酒造社) およびCIAP (宝酒造社) をそれぞれ用い、製品のプロトコルに従うことにより行なった。また、塩基配列の決定には、サンガー法(F.Sanger, Science, 214:1205-1210, 1981)を用いた。

【0024】

野生型cDNAである pUC18/T7(+)HVJRz(A.Katoら, Genes To Cells, 1:569-579, 1996) (図1) を出発材料として、以下の段階を経てM遺伝子を欠失したcDNAを構築した。M遺伝子とその近傍のDNA塩基配列を図2に、構築の概念図を図3にそれぞれ示した。

まず、M遺伝子を含むClaI断片をpUC18/T7(+)HVJRzより回収し、pHSG396(宝酒造社)のClaIサイトに挿入することによりpHSG-M-CC (図4) を得た。一方、pHSG396をApaLIで切断し、末端平滑化処理後セルフライゲーションすることによりApaLI部位を欠失させたpHSG396-dA (図4) を作製した。pHSG-M-CCのM遺伝子を含むEcoRI- BamHI断片を、pHSG396-dAをEcoRIおよび BamHIで切断処理後脱リン酸化処理を行なったものに挿入することにより、pHSG-dA-M-BE (図4) を得た。

【0025】

【実施例2】 M欠失型ベクターの作製

49merの合成オリゴヌクレオチド5'-ggcgatatctatagattccctaagttctcatagtagatgtgcaccggca-3' (EAリンカーF) (配列番号: 1) および5'-tgccggtgcacatctactatgagaacttaggaatctatagatatcgcc-3' (EAリンカーR) (配列番号: 2) を合成し、アニール処理後pCR2.1(インビトロジェン社)に挿入することによりpCR-EALを作製した。また、挿入断片の塩基配列が設計どおりであることを確認した。

【0026】

pCR-EALをEcoRVおよびApaLIで切断し、リンカー断片を切り出した。一方、pHS

G-dA-M-BEをEcoRVおよびApaLIで切断したものに上記リンカーを挿入することにより、pHSG-dA-dM-EA-EBを得た。

pHSG396をEcoRIで切断し、末端平滑化処理後セルフライゲーションすることにより得られたEcoRI部位を欠失したプラスミドをさらにBamHIで切断し、末端平滑化処理後セルフライゲーションすることによりEcoRIおよびBamHIの両切断部位を欠失したプラスミドpHSG-dE-dBを得た。

M遺伝子を含むClaI断片をpHSG-dE-dBのClaI部位に挿入しpHSG-dE-dB-M-CCを構築した。pHSG-dE-dB-M-CCをEcoRIおよびBamHIで切断したものに、pHSG-dA-dM-EA-EBより切りだしたEcoRI-BamHI断片を挿入することによりpHSG-dE-dB-dM-CCを得た。

pHSG-dE-dB-dM-CCのClaI断片を、pUC18/T7(+)HVJRzのClaI部位に挿入したプラスミドpHVJ-dMEAを構築した。以上の構築スキームを図5に示した。

【0027】

【実施例3】 M欠損型ベクターの作製

M遺伝子中の制限酵素部位、BsgI部位中に変異を持ち、M遺伝子の読み枠中に終止コドンが出現するように設計したオリゴヌクレオチドM-1(5'-ttaaaggcctaaaccgatctcagaattacg-3') (配列番号: 3) およびM-2(5'-tatcattccctgtctcagcctgcc-3') (配列番号: 4) をPCRプライマーとして用い、pUC18/T7(+)HVJRzを鋳型としてPCR反応を行った。PCR産物をpCR2.1にクローニングし、pCR-Mを得た(図6)。

pCR-Mの塩基配列を確認後、pCR-MをStuIおよびXcmIの両制限酵素で処理した断片をゲルから回収し、pHSG-M-CCをStuIおよびXcmIの両制限酵素で処理したものに挿入した。得られたプラスミドをpHSG-dM-CCと命名した。pHSG-dM-CCをClaIで切断して得られた断片を、pUC18/T7(+)HVJRzのClaI部位に挿入することにより、pHVJ-dMを得た。以上の構築スキームを図6に示した。

【0028】

【実施例4】 M欠失型およびM欠損型cDNAを用いた再構成試験

野生型(WT)、M欠失型(dMEA)、M欠損型(dM)の各cDNAを出発材料として、再構成試験を行った。センダイウイルスまたはM遺伝子の欠失もしくは欠損したセンダ

ウイルスのcDNAからウイルス粒子を再構成するために以下の方法を用いた。

通常のトリプシン処理でシャーレからはがしたLLCMK2細胞（サル腎臓由来細胞株）を直径10cmのプラスチックシャーレに 2×10^6 細胞播き、10%FBS（ギブコビーアールエル社）を含むMEM培地（ギブコビーアールエル社）中で、CO₂ 5%、37℃の条件下で24時間培養した。シャーレから培地を取り除き、PBSで一度洗浄した後、MOI (Multiplicity of infection) が2となるように 8×10^6 pfu/mlにPBSにて希釈したT7ファージ由来RNAポリメラーゼを発現可能な組換えワクシニアウイルスベクター、vTF7-3 (T.R.Fuerstら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126, 1986) の溶液を500 μ l滴下し、15分ごとにウイルス液が全体にいきわたるようにシャーレを揺らしながら1時間感染させた。

【0029】

一方、cDNA溶液を含む培地を以下のように作製した。まず、ポリスチレンチューブ中にFCS（牛胎児血清）を含まないOpti-MEM培地（ギブコビーアールエル社）500 μ lを入れ、その中にセンダイウイルスcDNAに由来するプラスミドpUC18/T7(+) HVJRz、pHVJ-dMEAおよびpHVJ-dMのうちいずれかひとつのプラスミド、pGEM-NP、pGEM-PおよびpGEM-Lの4種のプラスミドを、それぞれ20、5、2.5および5 μ gずつ加えた。さらに50 μ lのスーパーフェクト（SuperFect）（キアゲン社）を加え、室温に20分放置した。その中にOpti-MEM培地10mlを添加し、さらにRifampicinおよびCytosine arabinoside (Ara C) をそれぞれ終濃度100 μ g/mlおよび40 μ g/mlとなるように添加した。

1時間感染を行ったLLCMK2細胞を含む上記のシャーレからウイルス液を除去し、上記cDNA溶液を含む培地をデカンテーションにより添加した後、CO₂ 5%、37℃の条件下で48時間培養した。培地を除去せずに細胞をセルスクレーパーでかき取り、培地および細胞を一緒にして15ml遠心管に移した。1200rpm、5分の遠心後、上清を除去し、沈殿している細胞を200 μ lのPBSに懸濁した。

【0030】

【実施例5】 細胞懸濁液の発育鶏卵への接種とHAアッセイ

ウイルスが再構成されたか否かを評価するために、発育鶏卵を用いた検定を行った。実施例4において得られた、200 μ lのPBSに懸濁した細胞を 1×10^7 細胞/m

1の溶液とし、これを順次PBSにて希釈し、 1×10^6 、 1×10^5 細胞/mlの細胞懸濁液を作製した。この懸濁液を $100 \mu\text{l}$ ずつ発育鶏卵の10日卵に気室側より24Gの注射針を用いて接種した。

この鶏卵を 35.5°C の孵卵器内で3日間転卵しながら培養後、鶏卵の殻の気室の部分を取り、10mlのシリンジおよび18Gの注射針を用いて尿液を回収した。

回収した尿液をHAアッセイにより検定し、鶏卵内でウイルスが増殖したか否かの判定を行った。HAアッセイは以下のように行なった。

丸底の96穴プレートの2列目から12列目まで $50 \mu\text{l}$ のPBSを分注した。1列目にサンプルの尿液を $100 \mu\text{l}$ 加えた。1列目のサンプル $50 \mu\text{l}$ を2列目のPBSに加え攪拌することにより、サンプルの2倍希釈液を作製した。この2倍希釈液 $50 \mu\text{l}$ を3列目のPBSに加え攪拌することによりサンプルの4倍希釈液を作製した。同様の操作を繰り返すことにより二倍希釈系列を作製した。

【0031】

すべての列に、PBSで希釈した $50 \mu\text{l}$ の1% 鶏保存血（コスモバイオ社）を加え、 4°C で1時間保温した。赤血球の凝集を肉眼で観察し、凝集したもののうち、最もウイルス希釈率の高いものの希釈率を、HA活性として表1に示した。なお、ウイルスのcDNAとしては、野生型(pUC18/T7(+))HVJRz ; WT)、M欠損型(pHVJ-dM ; dM)、およびM欠失型(pHVJ-dMEA ; dMEA)を用いた。M欠失型については、2回の実験結果(dMEA2-1およびdMEA2-2)を示す。

【表1】

HA活性	
WT (野生型)	>16
dM (欠損型)	<2
dMEA2-1 (欠失型)	<2
dMEA2-2 (欠失型)	<2

野生型は16以上の値を示したが、そのほかのサンプルについては活性が認めら

れなかった。この結果は、M欠失型およびM欠損型cDNAを出発材料として用いた場合にはセンダイウイルスの通常の再構成試験においては伝播力のあるウイルスが生成されないことを示すものである。

【0032】

【実施例6】 プラーク形成試験

CV-1細胞を、6穴プレート（コーニング社、マイクロプレート6well）に 5×10^5 細胞ずつ播き、終夜培養した。

実施例4において最終的に得られたLLCMK2細胞を、 1×10^6 細胞/mlとなるようにPBSにて希釈して細胞懸濁液を作製し、1.5mlマイクロチューブ（エッペンドルフ社）に100 μ lずつ分注した。分注した細胞懸濁液の一部は、-80℃、10分の凍結処理および室温の水で3分間インキュベートする融解処理による凍結融解操作を3回繰り返した。すべての細胞懸濁液に、終濃度0.75 μ g/mlとなるようにトリプシンを加え、37℃、30分保温した。

CV-1細胞を培養したプレートより、培地を取り除き、PBSで一回洗浄後、トリプシン処理をした上記の希釈細胞懸濁液100 μ lを重層し、15分ごとに液を行き渡らせながら1時間処理した。あらかじめ約45℃に保温しておいた1% 寒天を含む1xMEM, 0.1% BSA, Rifampicin 100 μ g/ml, Ara C 40 μ g/ml, Trypsin 0.75 μ g/mlを3ml重層し、寒天が固まった後、倒置した。CO₂ 5%、37℃の条件下で5日間培養した。

培養後、寒天の上から固定液（エタノール：酢酸＝5：1）を1ml加え、90分室温に放置した。寒天を取り除き、200 μ lのアミドブラック溶液（0.5% Amido Black、エタノール：酢酸：水＝45：10：45）を加え、直後に水洗し、細胞を染色することにより、プラーク数の計測およびプラーク形状の評価を行なった。

【0033】

この結果を以下の表2および図7に示した。

【表2】

M欠失型およびM欠損型センダイウイルス再構成の効率

プラーク数

M遺伝子	凍結し溶解したもの		凍結しないもの
野生型	38	22	14
M欠損型(dM)	2	4	2
M欠失型(dMEA2-1)	27	26	60
M欠失型(dMEA2-2)	32	38	42

【0034】

ウイルスのcDNAとしては、野生型(pUC18/T7(+)HVJRz)、M欠損型(pHVJ-dM)、およびM欠失型(pHVJ-dMEA)を用いた。M欠失型については、2回の実験結果を示す。細胞懸濁液の凍結融解を行ったものと行わなかったものそれぞれについてプラーク数を測定した。プラークの数は、トランスフェクションしたLLCMK2細胞 1×10^5 個における再構成されたウイルスの数を示している。凍結融解を行ったものについては2回の実験を行った。センダイウイルスの再構成では、センダイウイルスゲノムに外来遺伝子を挿入した付加型ウイルスなどの変異ウイルスは再構成効率が下がることが報告されているが(Hasan et al., 1997)、M欠失型に関しては、野生型のそれとほぼ変わらない再構成効率を示した。M欠損型では、多少低い再構成効率を示した。また、トランスフェクション細胞を凍結融解したものではないものでは、どちらもそのプラークの数に大きな違いは見られなかった。

【0035】

表1および図7より明らかなように、M欠失型およびM欠損型cDNAに由来すると考えられるプラークが観察された(図7)。このプラークの大きさは、同時に行った陽性対照(図7; WT1およびWT2)において形成した野生型のプラークに比べ明らかに小さいものであった。プラークの形状をさらに詳細に検討するため、抗センダイウイルスポリクローナル抗体を用いてプラークの染色を行なった。なお、抗体は不活化精製センダイウイルスを抗原としてウサギに接種し、公知の方法で作製した。

【0036】

実施例6に記載の、固定、アミドブラックでの染色後のプラークを、抗センダイウイルス抗体とハイブリダイズした後、FITC結合した抗ウサギIgG、または抗マウスIgG抗体とハイブリダイズした後、蛍光実体顕微鏡で観察した。その結果、野生型、M欠失型およびM欠損型のプラークでシグナルが検出され、センダイウイルスのプラークであることを確認した(図8)。

野生型cDNA由来のプラークは、ほぼ円形を保っているのに対して、欠失型、欠損型cDNA由来のプラークは、大きさが小さいだけでなく、円形ではなく変形していることが顕微鏡下で観察された(図8)。

【0037】

[実施例7] 抗体染色によるプラークの処理

大きさ、形状ともに野生型と異なるこれらのプラークが、M欠失型、M欠損型cDNAに由来したものであるかどうかを、M蛋白質の有無で確認した。すなわち、これらのプラークを、抗Mモノクローナル抗体で染色し蛍光を観察した。

蛍光抗体によるプラークの染色は、以下の方法によった。

アミドブラックでプラークを染色後、その位置を肉眼で観察し、マーカーペンでマーキングをした。プラークを形成した6穴プレートを、各穴1mlのPBSで一回洗浄後、40倍に希釈した抗Mモノクローナル抗体を200 μ l重層し、37℃のCO₂インキュベーター内で45分間保温した。各穴を1mlのPBSで三回洗浄し、100倍に希釈したFITC結合抗マウスIgG抗体(コスモバイオ社)を200 μ l重層し、同様に45分間保温した。1mlのPBSで三回洗浄後、各穴1mlのPBSを重層し、蛍光実体顕微鏡下であらかじめマーキングしたプラークが染色されているかどうかを観察した。

観察後、一次抗体を抗センダイウイルスポリクローナル抗体、二次抗体をFITC結合抗ラビットIgG抗体(ICN Biomedicals社)に変え、同様の操作を行なった後、再び蛍光実体顕微鏡下で観察した。

【0038】

野生型cDNA由来のプラークは、抗センダイウイルス抗体、抗Mモノクローナル抗体両方で染色されるのに対して、M欠失型、欠損型cDNA由来のプラークでは、抗センダイウイルス抗体では染色されるが、抗Mモノクローナル抗体では染色されなかった。すなわち、このプラークは完全なMタンパク質を発現していない、M

欠失型、欠損型cDNA由来のプラークであることが示された。

以上の結果からM遺伝子を欠失または欠損したセンダイウイルス遺伝子に由来するプラークが得られた。また、このプラークを形成するウイルスは鶏卵中で増殖しないことから、細胞から出芽して上清にでることはない、すなわち伝播力を有さないが、プラークを形成することから、接触浸潤力を持つと考えられる。

【0039】

このような増殖様式は、F、HN蛋白質を介した細胞融合に起因するものと考えられる。すなわち、センダイウイルスのコードする蛋白質のうち、F、HNは膜タンパクとして細胞表面に発現し、M蛋白質はその裏打ちとして細胞の内側からF、HNを支えて出芽がおこるが、M欠失型の場合は、裏打ちがないために出芽がおこらない。しかし、F、HN蛋白質は細胞表面に発現しているため、この蛋白質を介して細胞融合がおこり、ウイルスゲノムは隣接した細胞に浸潤することが可能となる。

このようにして、出芽を伴わないウイルスの増殖が可能となると考えられる(図9)。

【0040】

【発明の効果】

本発明により細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さないRNAウイルスベクターを提供するすることが可能となった。本発明のRNAウイルスベクターを利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、従来よりも効率的に遺伝子導入、細胞移植等を行うことが可能となった。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DNAMEC Research Inc.

<120> RNA virus vector with contact-infiltration capability

<130> D3-002

<160> 4

<210> 1

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EcoRV-ApaLI linker

<400> 1

ggcgatatct atagattccc taagttctca tagtagatgt gcaccggca

49

<210> 2

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EcoRV-ApaLI linker

<400> 2

tgccggtgca catctactat gagaacttag ggaatctata gatatcgcc

49

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A primer used for generating a stop codon within M gene of SeV.

<400> 3

ttaaaggcct aaaccgatct cagaattacg

30

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A primer used for generating a stop codon within M gene of SeV.

<400> 4

tatcattccc tgtctcagcc tgcc

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プラスミド pUC18/T7(+)-HVJRz の構成を示す図である。

【図 2】

センダイウイルス cDNA における M 遺伝子領域、および該領域をサブクローン化または変異するためのスキームを示す図である。図中 E は転写終結配列、I は介入配列、S は転写開始配列を表す。プラスミドの構築に用いた制限酵素位置を棒で囲んで表す。

【図 3】

センダイウイルス cDNA における M 遺伝子領域に変異処理を施すスキームを示す図である。A の上段はセンダイウイルスゲノムの構造を表し、NP、P(P/C)、M、F

、HN、Lの各遺伝子の配置を示した。下段はM遺伝子の構造と制限酵素位置、およびM遺伝子の欠損型を構築する際に用いたM1およびM2プライマーの位置を表す。B、CはM遺伝子欠損型および欠失型の構築スキームを表す。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。DはM遺伝子欠損型と野生型M遺伝子との塩基配列およびアミノ酸配列の比較を表す。図中ドットは、野生型と配列が同一であることを表す。「Ter」は終結コドンを表す。数字はM遺伝子における位置を表す。

【図4】

センダイウイルスcDNAにおけるM遺伝子領域をサブクローン化するスキームを示す図である。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。

【図5】

サブクローン化したセンダイウイルスM遺伝子領域に変異処理を施し、全長のセンダイウイルスcDNAのM遺伝子領域と置換することによりM欠失型cDNAを構築するスキームを示す図である。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。

【図6】

サブクローン化したセンダイウイルスM遺伝子領域に変異処理を施し、全長のセンダイウイルスcDNAのM遺伝子領域と置換することによりM欠損型cDNAを構築するスキームを示す図である。図中×は変異によりその制限酵素部位が切断されなくなっていることを表す。

【図7】

M遺伝子に変異処理を施したセンダイウイルスcDNAに由来するブランクを示す図である。野生型M遺伝子(WT1およびWT2)、M遺伝子欠損型(dM)、およびM遺伝子欠失型(dMEA2-1およびdMEA2-2)の結果を表す。

【図8】

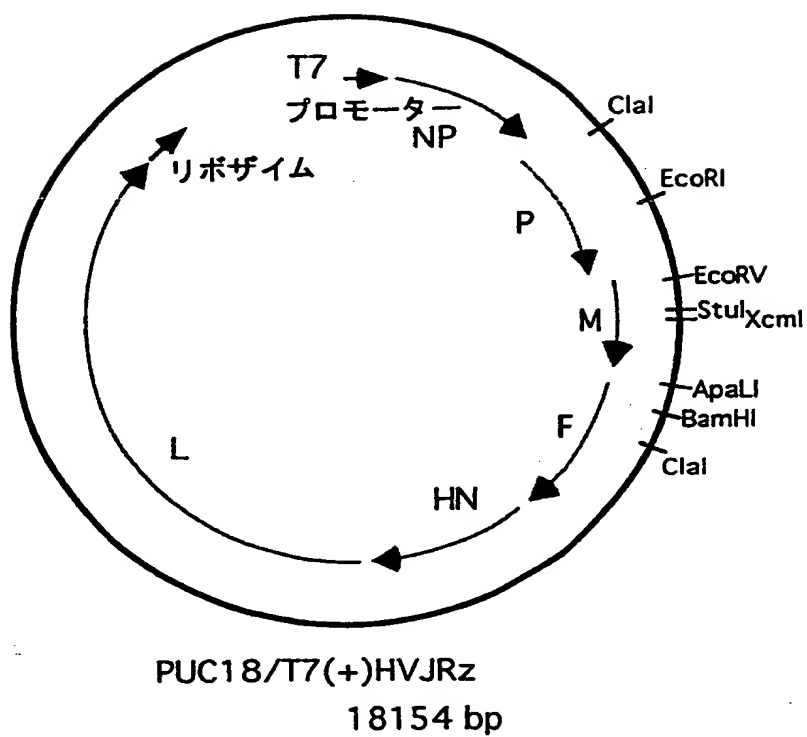
M遺伝子に変異処理を施したセンダイウイルスcDNAに由来するブランクを抗センダイウイルス抗体で染色したものを示す図である。野生型M遺伝子(WT)、M遺伝子欠損型(dM)、およびM遺伝子欠失型(dMEA)の結果を示す。

【図9】

Mに変異が生じたセンダイウイルスゲノムの接触浸潤様式を示す模式図である。上段は野生型センダイウイルスゲノムの場合を表し、感染粒子が形成され、接触浸潤も起こる。Mに変異が生じたセンダイウイルスゲノムは、感染粒子を形成する能力を欠き、接触浸潤のみによりゲノムが周囲の細胞へ導入される。

【書類名】 図面

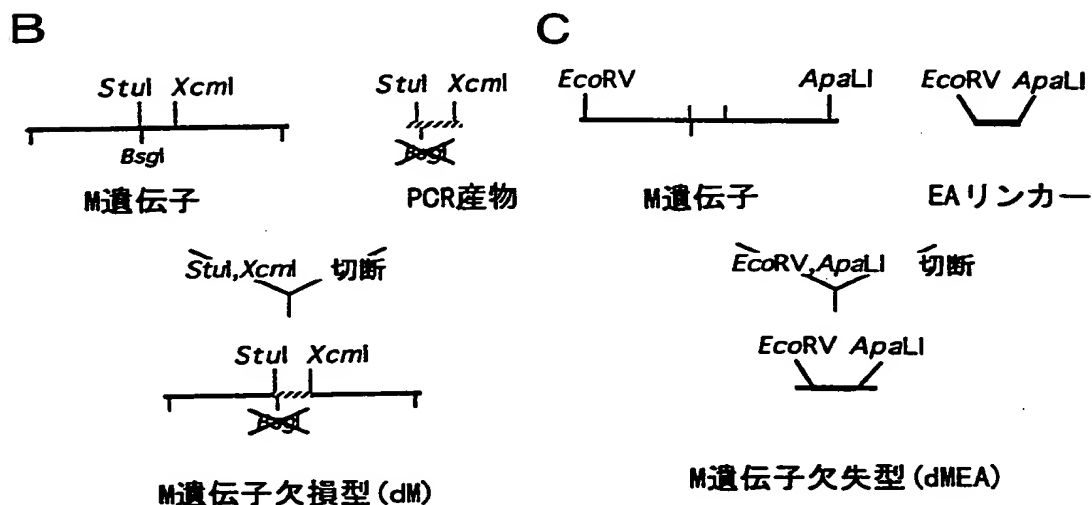
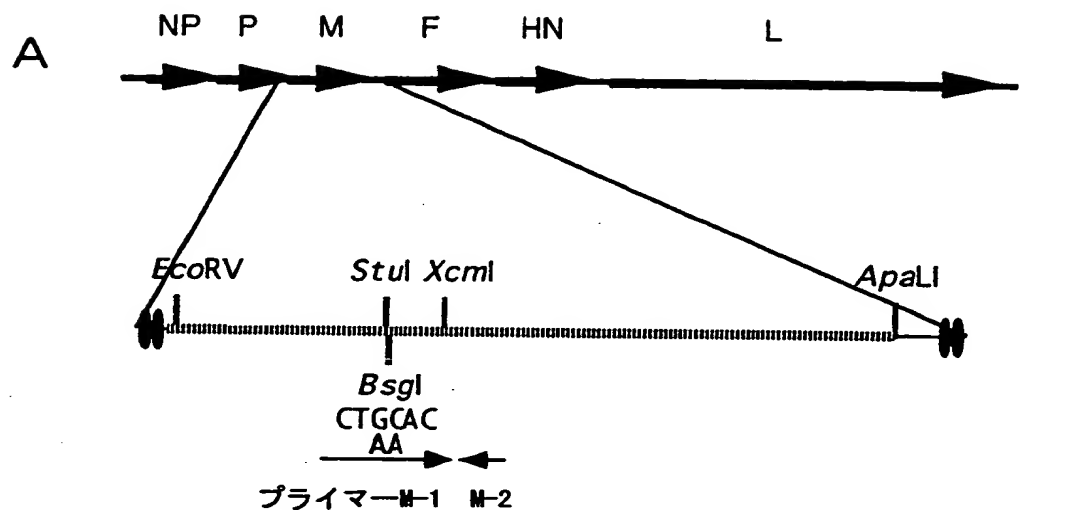
【図 1】



【図 2】

E	I	S	EcoRV	
TAAGAAAAAC	TTAGGGTGAA	AGAAATTTCA	CCTAACACGG	CGCAATGGCA
GATTCCCTAA	GTTCTCATAT	GAGGATAACG	GTA	CTGAGAACTG
GTCCGGATAA	GAAAGCCATC	CCCCACATCA	GGATTGTCAA	GGTAGGAGTC
ATGGAGTGAG	ATACCTAGAT	TTATTGCTCT	TGGGTTTCTT	TGAGACACCG
CCAATCTAGG	GAGCGTATCT	GACTTGACAG	AGCCGACCAG	CTACTCAATA
GGTCGTTACC	CATAGGTGTG	GCCAAATACT	ACGGGACTGA	TCAGGAACTC
BspI			M-1プライマー	StuI
GCACCGATCT	CAGAATTACG	GTGAGGAGGA	CTGTTGAGC	AGGAGAGATG
AA		XcmI	M-2プライマー	
TGGTGGATTC	GATTGGTGCT	CCACTCCTAC	CATG	TCAGGCTGAGA
TATTTAATGC	AAACAAGGTC	GCACTAGCTC	CCAATGCCT	CCCTGTGGAC
GACTCAGAGT	GGTGTGTTGTC	AATGGGACAT	CTCTAGGGGC	AATCACCATA
CAAAGACCCT	TGCAGACCTT	GCATTGCCCA	ACTCTATATC	CGTTAATTTA
TCAAGACCGG	GATCTCCACA	GAACAAAAGG	GGTACTCCC	AGTACTTGAT
AGAAAAAGCT	CAATTTTATG	GTGCACCTCG	GGTTGATCAG	GAGAAAGGTC
ACTCTGTTGA	GTA	CTGCAAG	AGCAAGATTG	AGAGAATGCG
TAATCGGCGG	TATAAGCTTC	CATGTTCAGG	TTATTGGGAC	ACTATCTAAG
GTCAGCTCGC	ATGGAAGAGG	GCAGTCTGCT	TCCCATTAA	GGATGTGAAT
ACATGGTGAT	TTGGGCGGCA	TCTGTAGAAA	TCACAGGCGT	CGATGCGGTG
CCATCCCTCG	TGATTTCCGC	TACTACCCTA	ATGTTGTGGC	TAAGAACATC
GAAAGCTGTA	AA	Apal		GACACCACCT
GGCAGTCGGA	GCCACCGGGT	CCTCCTTGT	CTTAA	TAAG
		E	I	S
		TAAG	AAAAA	CTT
				AG

【図 3】



D

	BspI												
WT塩基配列	CAG	GAA	CTC	TTA	AAG	GCC	TGC	ACC	GAT	CTC			371
dM塩基配列	AA		
WTアミノ酸配列	Gln	Glu	Leu	Leu	Lys	Ala	Cys	Thr	Asp	Leu			110
dMアミノ酸配列	Ter			

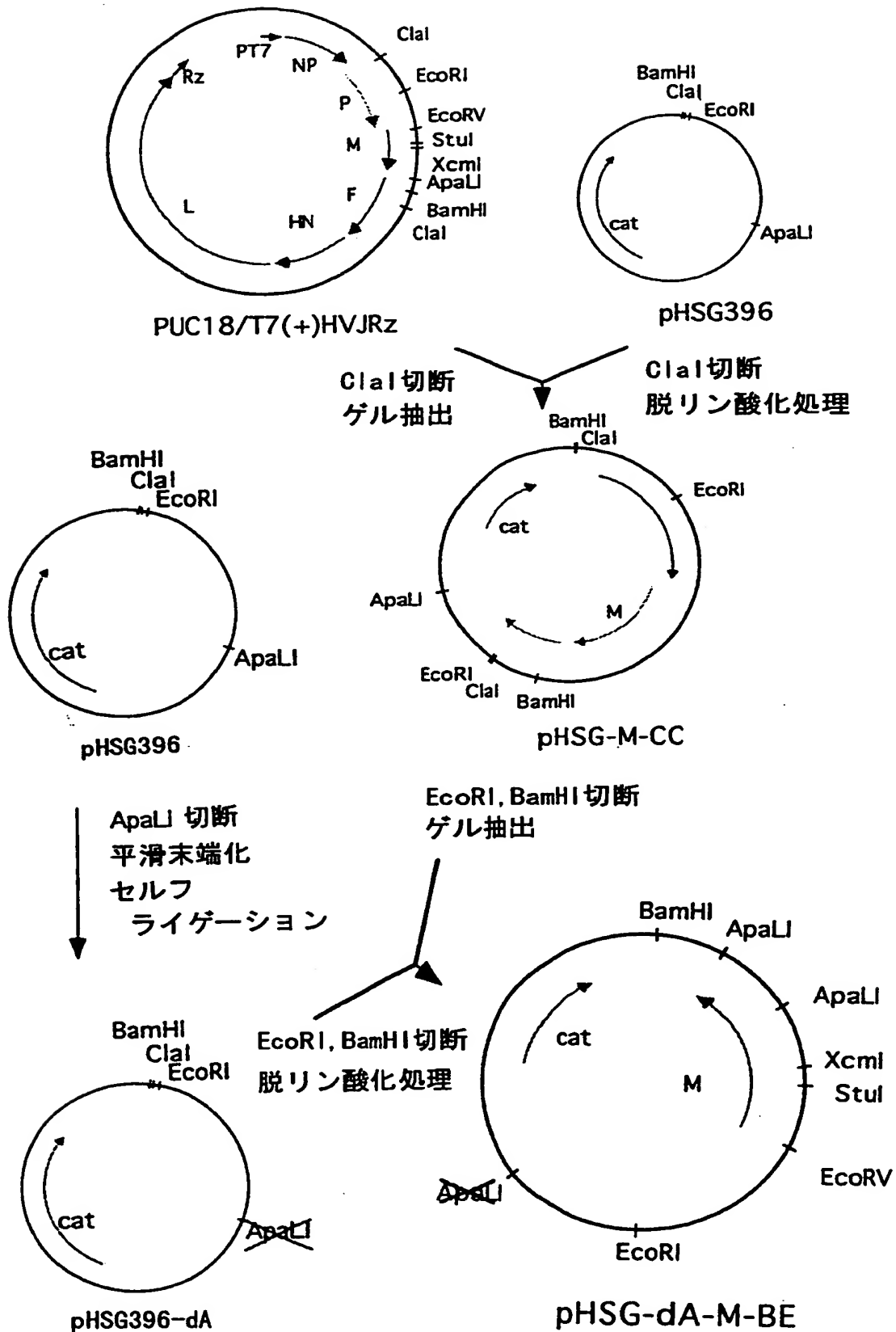
E

EAリンカー

EcoRV												ApaLI				
GGC	GAT	ATC	TAT	AGA	TTC	CCT	AAG	TTC	TCA	TAG	TAG	ATG	TGC	ACC	GGC	A
CCG	CTA	TAG	ATA	TCT	AAG	GGA	TTC	AAG	AGT	ATC	ATC	TAC	ACG	TGG	CCG	T

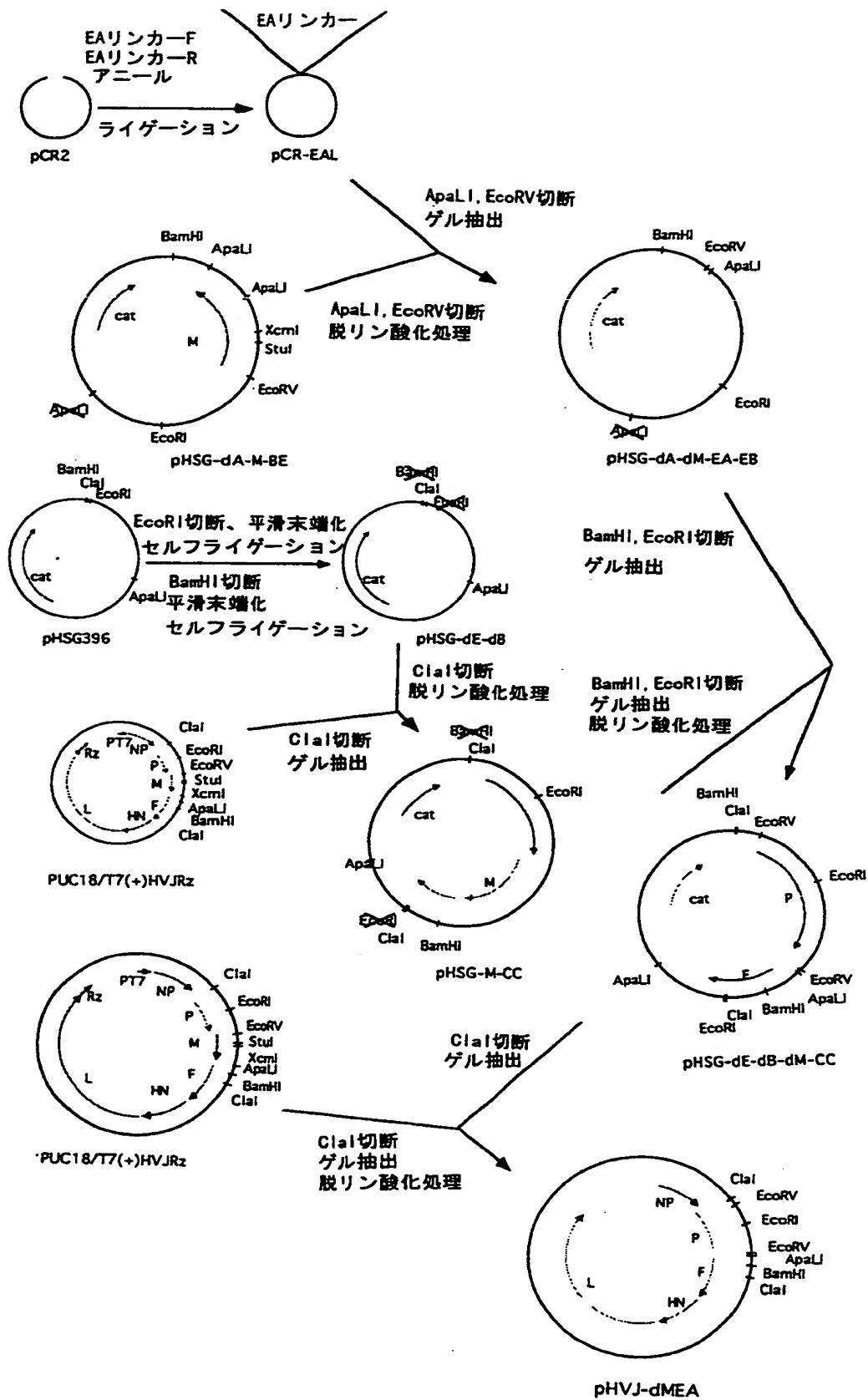
特平 10-2273

【図4】

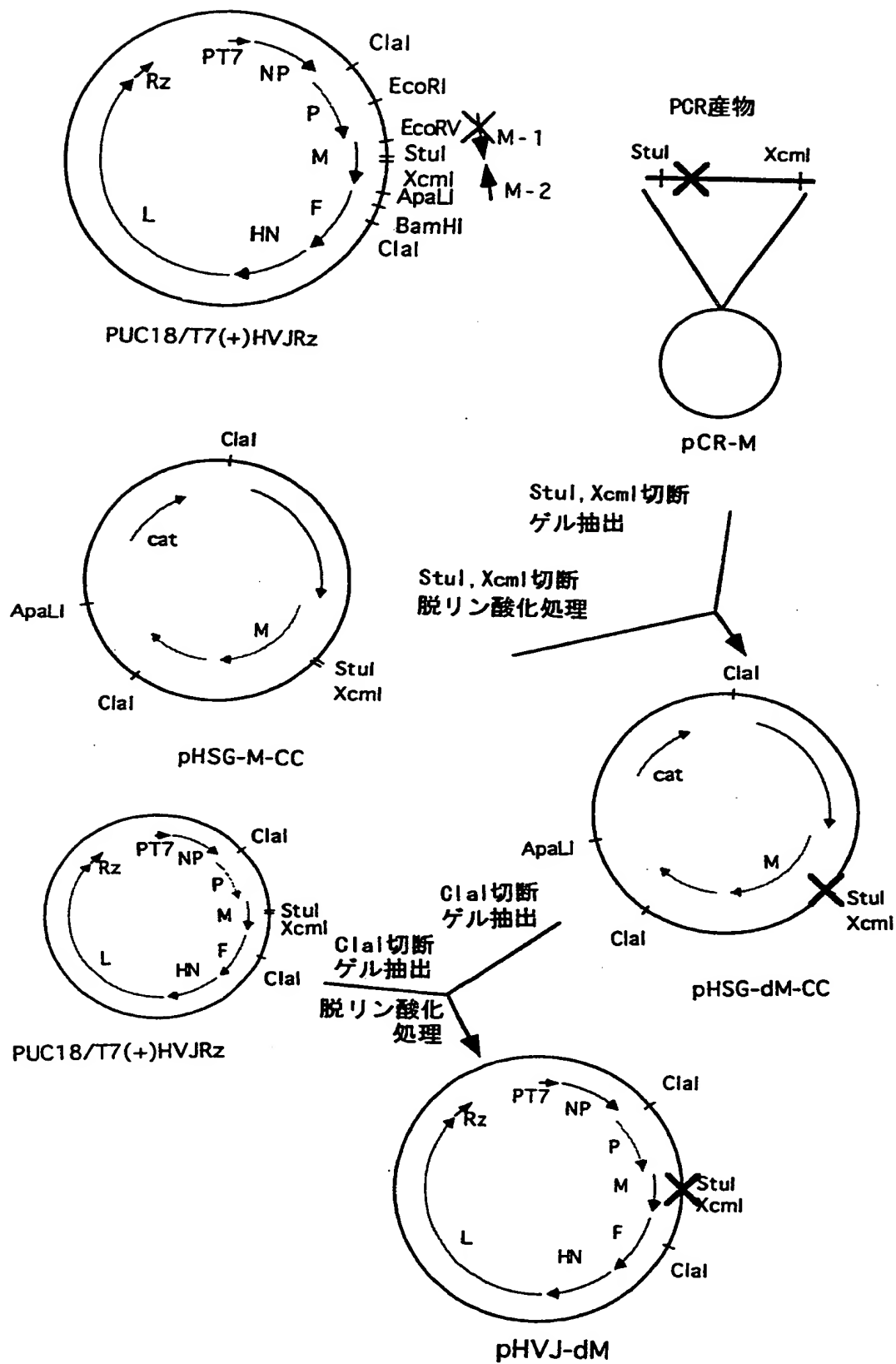


特平 1 0 - 2 2 7 3

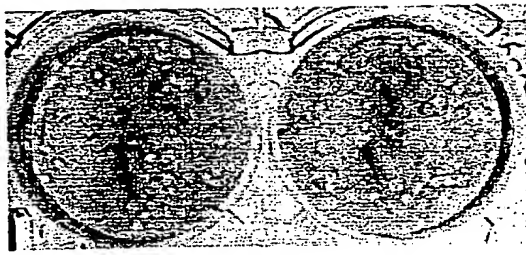
【図 5】



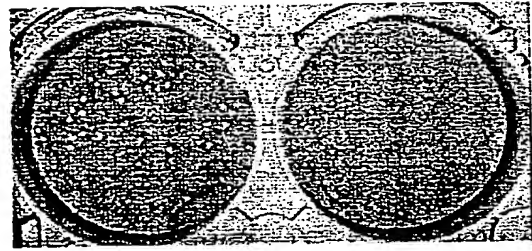
【図 6】



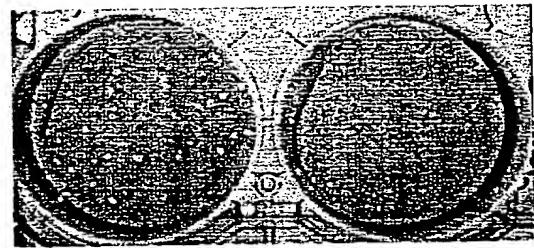
【図 7】



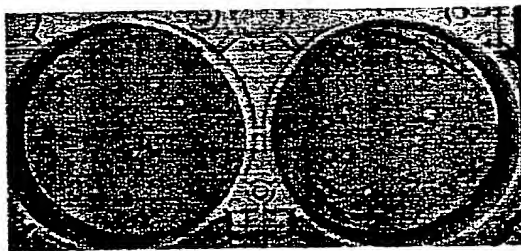
WT2



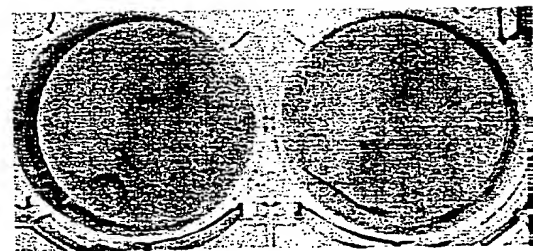
dMEA2-1



dMEA2-2



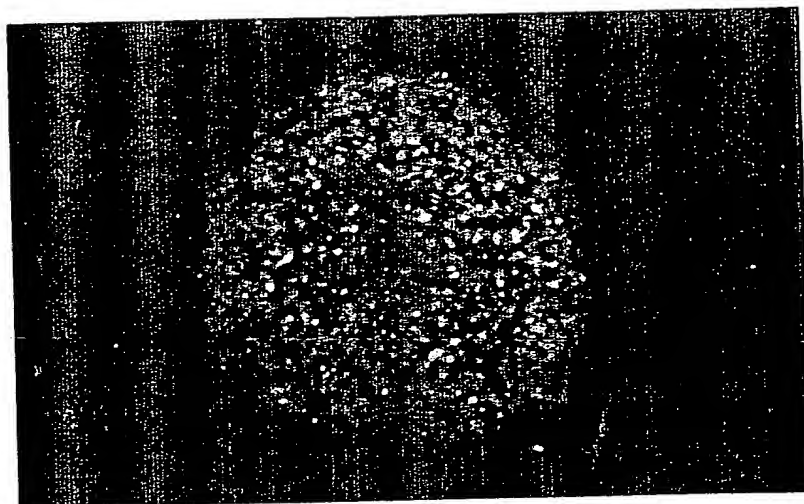
WT1



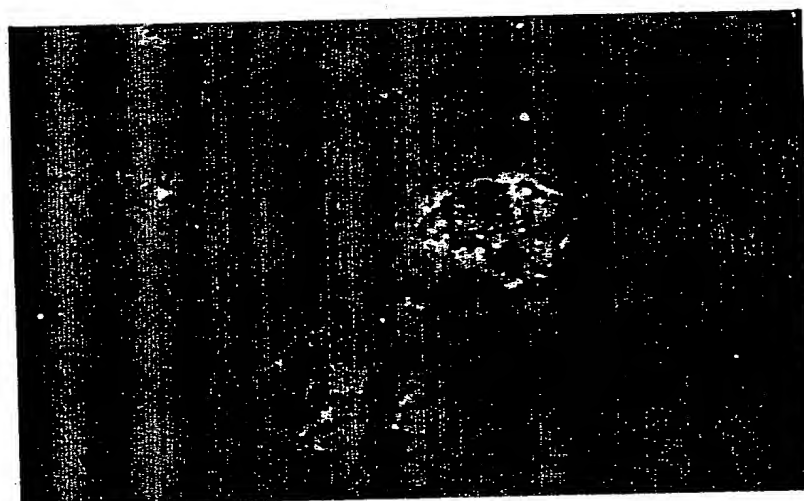
dM

【図 8】

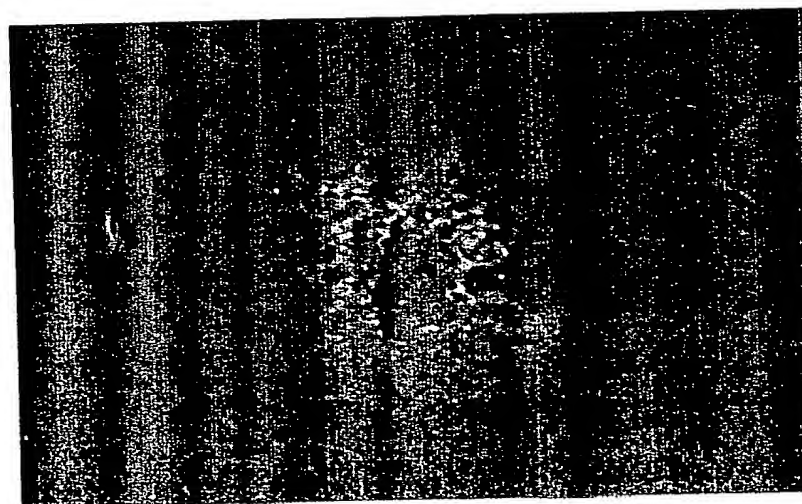
WT



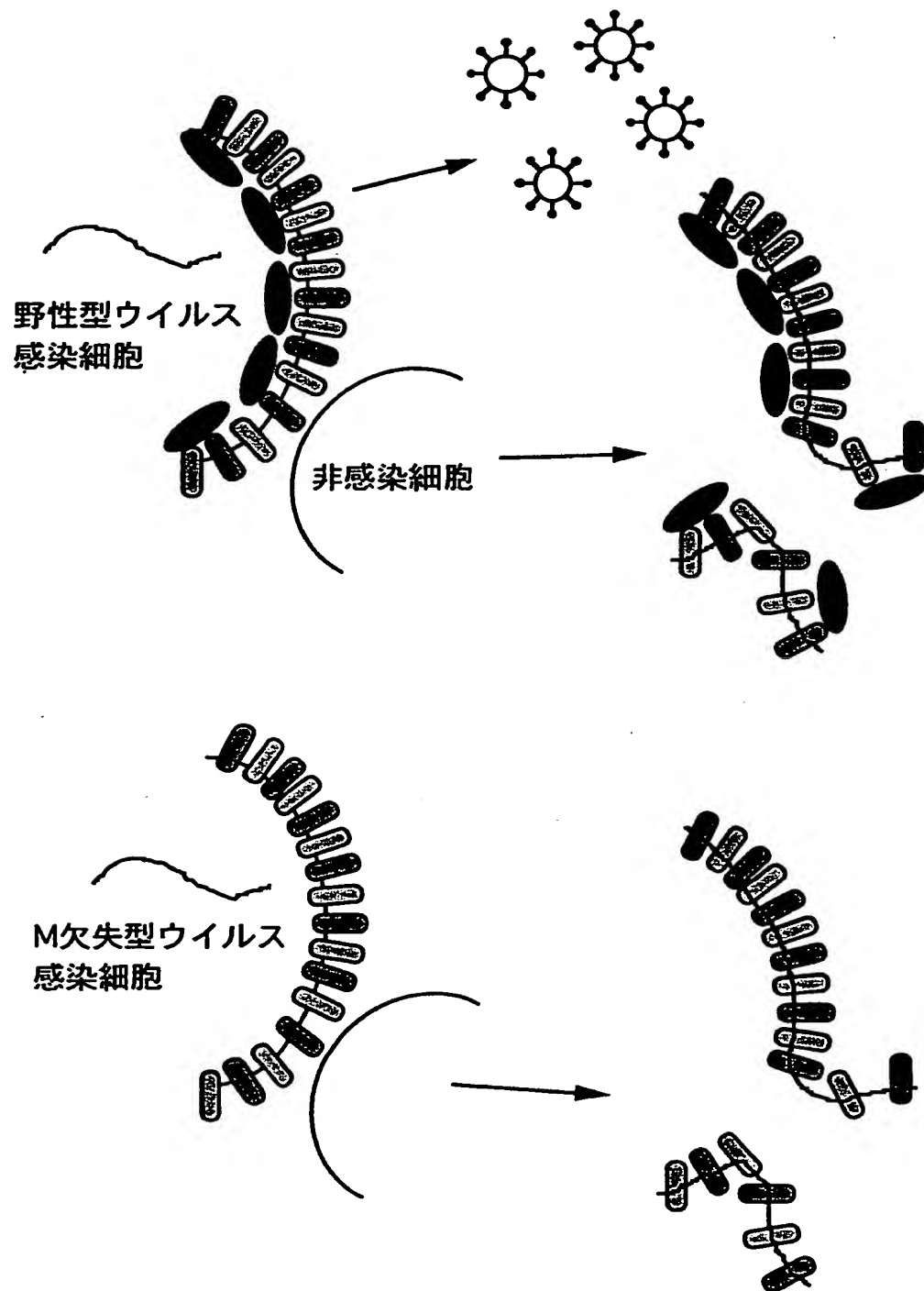
dM



dMEA



【図9】



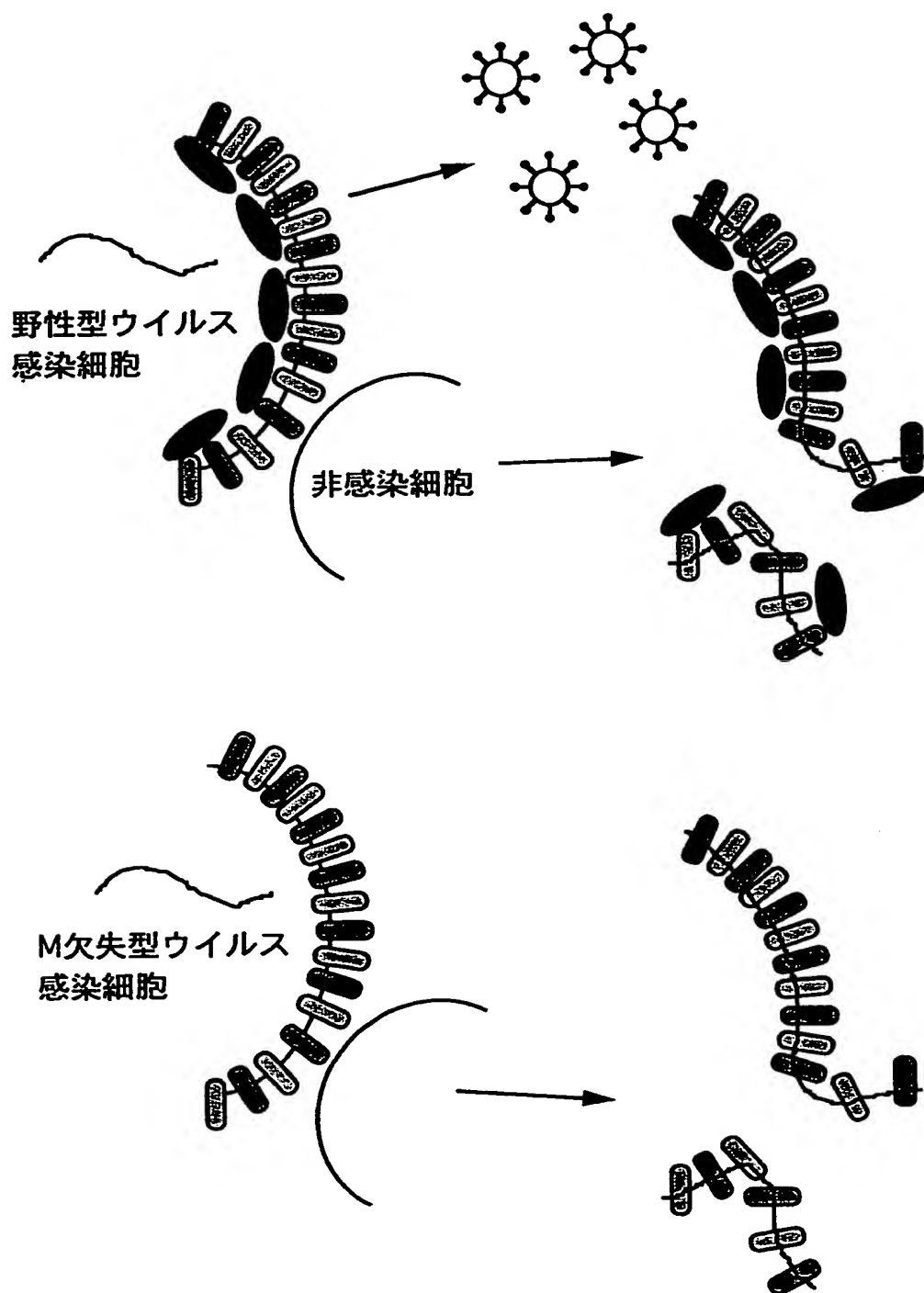
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子治療等に有用な、RNAウイルスベクターを提供することを課題とする。

【解決手段】 細胞感染能、RNA自律複製能および接触浸潤力を有するが伝播力を有さないRNAウイルスベクターを提供することが可能となった。本発明のRNAウイルスベクターを利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、従来よりも効率的に遺伝子導入、細胞移植等を行うことが可能となった。

【選択図】 図9



【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595155107
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

【代理人】

申請人
【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595155107]

1. 変更年月日	1995年11月 1日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
氏 名	株式会社ディナベック研究所

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)